

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-023657
 (43)Date of publication of application : 25.01.2000

(51)Int.Cl. C12M 1/00
 C12N 5/10
 C12N 15/09
 G01N 1/00

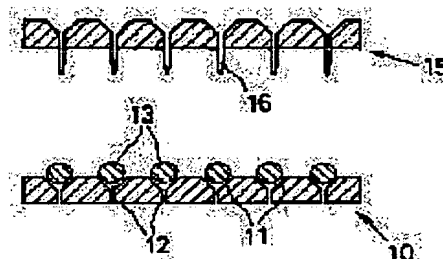
(21)Application number : 10-193931 (71)Applicant : NATL FOOD RES INST
 (22)Date of filing : 09.07.1998 (72)Inventor : KIKUCHI YUJI
 ZEN KYOSHAKU
 TOSHIYOSHI HIROSHI
 FUJITA HIROYUKI

(54) MICROCAPILLARY ARRAY, ITS PRODUCTION, AND MATERIAL INJECTION DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a microcapillary array capable of individually and properly manipulating cells, therefore useful in e.g. gene transfer operations, so designed that a plurality of hollow capillaries each consisting of a thin filmy material and having a specified outer diameter are penetrated through a substrate and projected from one surface of the substrate so as to represent a two-dimensional array fashion.

SOLUTION: This microcapillary array is so designed that a plurality of hollow capillaries 16 each consisting of a thin filmy material such as silicon oxide or silicon nitride and having an outer diameter of 2-10 μm are penetrated through a substrate such as a silicon substrate and projected from one surface of the substrate so as to represent a two-dimensional array fashion; wherein the respective tips of these hollow capillaries 16 communicate with the outside at the respective parts other than the forefront tips. Furthermore, it is preferable that each of the microcapillaries is made by the following procedure: a fine hole is bored from one surface of the substrate inward, a thin film is formed on the inner wall of the hole, the substrate is then etched from the opposite surface to expose the hollow structure consisting of the thin film formed on the inner wall of the hole, and the tip of the hollow structure is opened.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.07.1998
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The micro capillary tube array characterized by penetrating a substrate, and for two or more hollow capillary tubes with an outer diameter of 2-10 micrometers projecting, and preparing them from one front face of said substrate.

[Claim 2] The micro capillary tube array characterized by penetrating said substrate, and for two or more hollow capillary tubes which consist of the thin film quality of the material formed in a substrate front face projecting, and preparing them from one front face of said substrate.

[Claim 3] It is the micro capillary tube array according to claim 2 which said substrate is a silicon substrate and is characterized by said thin film quality of the material being silicon oxide or silicon nitride.

[Claim 4] The point of said hollow capillary tube is a micro capillary tube array according to claim 1, 2, or 3 characterized by being open for free passage with the exterior in parts other than the latest section.

[Claim 5] The production approach of the micro capillary tube characterized by to include the process at which the hollow structure which consists of a thin film which etched said substrate from the process which processes a small hole toward the interior from one front face of a substrate, the process which forms a thin film in the wall of said hole, the front face which processed said hole, and the front face of the opposite side, and formed in the wall of said small hole exposes, and the process to which opening of the point of the hollow structure which consists of said thin film carries out.

[Claim 6] The process to which opening of said point is carried out is the production approach of the micro capillary tube according to claim 5 characterized by leaving and carrying out opening of the latest section of said hollow structure.

[Claim 7] The process which processes two or more small holes in a predetermined array toward the interior from one front face of a substrate, The process at which two or more hollow structures which consist of a thin film which etched said substrate into the wall of two or more of said small holes from the process which forms a thin film, the front face which processed said small hole, and the front face of the opposite side, and was formed in the wall of said small hole are exposed, The production approach of the micro capillary tube array characterized by including the process to which opening of the point of two or more hollow structures which consist of said thin film is carried out.

[Claim 8] The process to which opening of said point is carried out is the production approach of the micro capillary tube array according to claim 7 characterized by leaving and carrying out opening of the latest section of said hollow structure.

[Claim 9] The process to which opening of the point of the process and hollow structure of processing said two or more small holes is carried out is the production approach of the micro capillary tube array according to claim 7 or 8 characterized by carrying out by focusing ion beam machining.

[Claim 10] The process to which opening of the point of the process and hollow structure of processing said two or more small holes is carried out is the production approach of the micro capillary tube array according to claim 7 or 8 characterized by carrying out by ICP-RIE processing.

[Claim 11] It is the creation approach of the micro capillary tube array of claim 5-10 characterized by for said substrate being a silicon substrate and said thin film consisting of silicon oxide or silicon nitride given in any 1 term.

[Claim 12] The matter injector characterized by including a means to drive relatively the means, said cell maintenance means, and said micro capillary tube array for making a cell maintenance means to hold two

or more cells in a predetermined pitch array, the micro capillary tube array which a tip equips with two or more hollow capillary tubes with an outer diameter of 2-10 micrometers projected from the substrate in said predetermined pitch array, and said micro capillary tube array inhale or breathe out the matter.

[Claim 13] The matter impregnation approach characterized by including the step which holds two or more cells in a predetermined pitch, the step which attracts the matter to the micro capillary tube array arranged in said predetermined pitch, the step which thrusts into the cell corresponding to each capillary tube the tip of a micro capillary tube array which attracted said matter, and the step which injects the matter in a capillary tube into a cell.

[Claim 14] The matter impregnation approach characterized by including the step which holds two or more cells in a predetermined pitch, the step which thrusts into the cell corresponding to each capillary tube the tip of the micro capillary tube array arranged in said predetermined pitch, the step which attracts the matter in the cell which was able to be pierced in the capillary tube in a capillary tube, and the step which injects into other cells the matter attracted in the capillary tube.

[Claim 15] The cell which carried out fissiparity from the cell into which the matter was injected by the approach according to claim 13 or 14, and its cell.

[Claim 16] The adult obtained from the cell into which the matter was injected by carrying out fissiparity by the approach according to claim 13 or 14.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the microinjection array system used for injecting a gene etc. into a cell, the micro capillary tube array used for it, and its manufacture approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, the so-called research and development of the biotechnology which is progressing quickly on the basis of biology, medicine, pharmaceutical sciences, biochemistry, gene engineering, etc. are progressing at an ever-advancing speed, and are progressing to the elucidation of the living thing function in DNA level from an organization or research on cell level. especially, the gene recombination DNA technique in which it will be regard as the nucleus technique in respect of application of biotechnology in the future develop from the drugs production for the original microorganism, and amelioration of high animals and plants, such as agricultural products and livestock, production of a food material or a chemistry article, gene therapy, and the researches and developments covered extensively variably, such as an animal duplicate (cloning), be further further. In research of such biotechnology, the needs to handling of biopolymers, such as a cell, a nucleus, a chromosome, DNA, and protein, are high, and many attempts to which it is going to apply the outstanding function which the living thing has in engineering or industrially are also made.

[0003] as the approach of injecting matter, such as DNA, into a cell -- the electroporation method and party Kurgan -- law, the microinjection method, the membrane fusion method, etc. are learned. The electroporation method is the approach of making the cell permeability temporarily, applying an electric-field pulse to a cell. The approach of the party Kurgan method accelerating the metal particles to which matter, such as DNA, was made to adhere, applying to a cell, and driving into intracellular, the method of a microinjection method stabbing a micro capillary tube into a cell, and pouring in matter, such as DNA, and a membrane fusion method are the approaches of making unite with a cell membrane the liposome which enclosed the matter using chemicals, such as a polyethylene glycol, and making it unite with a cell. Since a cell has the magnitude of several micrometers to dozens of micrometers, and micro meter size, in order to treat these detailed objects well, the detailed tool set by the object is needed. The above-mentioned approach is used as a tool which injects a gene into a cell.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although an activity starts since a gene is injected into a cell in research of biotechnology, the approach or tool which can inject a gene into many cells efficiently till the present is not developed. Since the above-mentioned electroporation method was an approach of pouring in by treating a cell as an ensemble rather than being individual, it had be [many wastes of a cell / and] problems that the effectiveness of transgenics actuation was very bad. The same is said of the party Kurgan method. Although the microinjection method was an approach that transgenics could be performed certainly, since transgenics was completed only into the cell of a piece at once, there was a problem that the effectiveness of transgenics actuation was very bad.

[0005] This invention was made in view of the present condition that neither the actuation tool which can handle a cell individually and correctly in this way, nor the actuation technique is established, and aims at offering the actuation tool which can handle a cell individually and correctly. This invention aims at offering the art which can process a lot of cells again after holding the property of piped mode operation.

[0006]

[Means for Solving the Problem] By array-izing a detailed capillary tube using the ultra-fine processing technology used for manufacture of a semiconductor device etc., this invention develops the microinjection array system in which batch processing of transgenics actuation is possible for many cells to individual actuation and the coincidence of a cell, and aims at improvement in effectiveness of a transgenics activity.

[0007] Drawing 1 is the conceptual diagram of the gene pouring-in method by the microinjection array system of this invention. The microinjection array system of this invention is equipped with the micro chamber array 10 and the micro capillary tube array 15. The micro chamber array 10 is equipped with the micro chamber 11 of a large number which can hold the cell 13 of a piece piece according to an individual. If the micro chamber 11 consists of a free passage hole 12 which is open for free passage at the pars basilaris ossis occipitalis of the pit which became depressed from the front face, and a pit and makes the magnitude of a pit somewhat more smallish than the diameter of a cell 13, the prehension of only the cell of a piece of it will be attained. At the time of cell prehension, in the suspension by which the cell entered on the micro chamber 11, if negative pressure is applied to a pit from behind through a sink and the free passage hole 12, negative pressure suction immobilization of the cell 13 of a piece will be carried out at one chamber 11. By array-izing a micro chamber, many cells can be collectively arranged and fixed to the shape of an array.

[0008] The micro capillary tube array 15 is equipped with the micro capillary tube 16 of a large number which have a tip with an outer diameter of about 2-10 micrometers which arranged in the shape of an array and was formed in the same array as the array of the micro chamber 11, using the micro capillary tube 16, bundles up matter impregnation of DNA etc. to all the cells 13 held at the micro chamber 11, and performs it. It is characterized by for two or more hollow capillary tubes with an outer diameter of 2-10 micrometers penetrating a substrate, and for the micro capillary tube array by this invention projecting from one front face of a substrate, and being prepared.

[0009] It is characterized by for two or more hollow capillary tubes which consist of the thin film quality of the material formed in a substrate front face again penetrating a substrate, and for the micro capillary tube array by this invention projecting from one front face of a substrate, and being prepared. A substrate can be used as a silicon substrate and the thin film quality of the material can be used as silicon oxide or silicon nitride. As for the point of a hollow capillary tube, it is desirable that it is open for free passage with the exterior in parts other than the latest section.

[0010] The production approach of the micro capillary tube by this invention is characterized by to include the process at which the hollow structure which consists of a thin film which etched a substrate from the process which processes a small hole toward the interior from one front face of a substrate, the process which forms a thin film in the wall of a hole, the front face which processed the hole, and the front face of the opposite side, and formed in the wall of a small hole exposes, and the process to which opening of the point of the hollow structure which consists of a thin film carries out. It is desirable to leave and carry out opening of the latest section of hollow structure at the process to which opening of the point is carried out.

[0011] The production approach of the micro capillary tube array by this invention Moreover, the process which processes two or more small holes in a predetermined array toward the interior from one front face of a substrate, It is characterized by including the process at which two or more hollow structures which consist of a thin film which etched the substrate into the wall of two or more small holes from the process which forms a thin film, the front face which processed the small hole, and the front face of the opposite side, and was formed in the wall of a small hole are exposed, and the process to which opening of the point of two or more hollow structures which consist of a thin film is carried out. It is desirable to leave and carry out opening of the latest section of hollow structure at the process to which opening of the point is carried out. Focusing ion beam machining, or ICP and RIE processing can perform the process to which opening of the point of the process and hollow structure of processing two or more small holes is carried out.

[0012] A substrate can be used as a silicon substrate and a thin film can be formed with silicon oxide or silicon nitride. A thin film is good also as a metal thin film formed by approaches, such as vacuum evaporation. The matter injector by this invention is characterized by to include a means to drive relatively the means, the cell maintenance means, and said micro capillary tube array for making a cell maintenance means to hold two or more cells in a predetermined pitch array, the micro capillary tube array which a tip

equips with two or more hollow capillary tubes with an outer diameter of 2-10 micrometers projected from the substrate in said predetermined pitch array, and a micro capillary tube array inhale or breathe out the matter.

[0013] Moreover, the matter impregnation approach by this invention is characterized by including the step which holds two or more cells in a predetermined pitch, the step which attracts the matter to the micro capillary tube array arranged in said predetermined pitch, the step which thrusts into the cell corresponding to each capillary tube the tip of a micro capillary tube array which attracted the matter, and the step which injects the matter in a capillary tube into a cell.

[0014] The matter impregnation approach by this invention is characterized by to include the step which holds two or more cells in a predetermined pitch, the step which thrusts into the cell corresponding to each capillary tube the tip of the micro capillary tube array arranged in said predetermined pitch, the step which attracts the matter in the cell which was able to be pierced in the capillary tube in a capillary tube, and the step which injects into other cells the matter attracted in the capillary tube again. This invention is the cell which carried out fissiparity again from the cell into which the matter was injected by the above-mentioned approach, and its cell. This invention is the adult obtained from the cell into which the matter was injected by carrying out fissiparity by the above-mentioned approach again.

[0015] The matter injector or the matter impregnation approach of this invention can be used in order to inject the fluorochrome biopolymers, such as DNA and protein, and for indicators etc. into a cell, and it can be used for artificial amelioration and the breeding of animals and plants. According to this invention, by array-ization of a transgenics device, the transgenics actuation for many cells is attained and working efficiency and DNA installation effectiveness can be improved sharply. Moreover, since the gene pouring-in method of this invention is a direct impregnation method, it can perform transgenics certainly compared with other methods.

[0016]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the gestalt of operation of this invention is explained with reference to a drawing. First, drawing 2 - drawing 4 are used and the production approach of a micro capillary tube array is explained. Drawing 2 shows the processing process of a silicon substrate that a micro capillary tube is formed. The hole 21 of a large number which prepare the silicon substrate 20 with a thickness of about 200-400 micrometers, have the outer diameter of about 2-10 micrometers in it like drawing 2 (a) as shown in drawing 2 (b), and have a depth of 50 micrometers or more is aligned in the shape of a grid, and is formed. Processing which used the focused ion beam (Focused Ion Beam:FIB), or high density plasma etching (Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching:ICP-RIE) can perform the process which forms this hole 21.

[0017] Although processing takes time amount to processing by FIB in order to make one hole 21 at a time, moving a silicon substrate 20 in step on a precision stage, it can form the structure in which the point of a hole sharpened. Consequently, the radius of curvature of a point can produce about 0.1 micrometers and the micro capillary tube which sharpened keenly through the below-mentioned process. It is more desirable for a point to sharpen keenly, though natural as capillary tube structure for transgenics.

[0018] Moreover, processing by ICP-RIE forms the pattern of a hole in the photoresist applied to the silicon substrate surface according to a photolithography process, and forms a hole by etching by the high density plasma of reactant ion by using the photoresist as a mask. Although the ICP-RIE method can form many holes at once by short-time processing, it cannot make the tip of a hole thin like FIB processing.

[0019] Thin film formation is performed after that to the silicon substrate 20 in which the hole was formed, using approaches, such as thermal oxidation, a heavy dope, the gaseous-phase depositing method, and sputtering. For example, as shown in drawing 2 (c), the whole surface is oxidized and it covers by the silicon oxide (SiO₂) film 22 also including the wall part of a hole 21. Formation of the silicon oxide film 22 to the wall of a substrate front face and a hole 21 can be performed by heating a silicon substrate at about 1150 degrees C for example, in an oxygen ambient atmosphere. An oxide film with a thickness of about 0.2 micrometers is formed with heating of 1 hour, and an oxide film with a thickness of about 1 micrometer can be formed with heating of 10 hours. In order to secure the reinforcement of the micro capillary tube finally formed, the thickness of the silicon oxide film 22 is about 1 micrometer. When replacing with the silicon oxide film and forming a silicon nitride film, it can form by mixing SiH₄ and

ammonia by the low voltage gaseous-phase depositing method (LPCVD), and making it react at 800 degrees C.

[0020] Next, a glass substrate is processed as shown in drawing 3. As shown in drawing 3 (a), the glass substrate 30 with a thickness of about 0.5mm is prepared. By etching the glass substrate 30 in fluoric acid by making chromium and gold into a resist, as shown in drawing 3 (b), it leaves the periphery section 31 to one side, a crevice 32 is formed, and it processes dished. Furthermore, as shown in drawing 3 (c), the through tube 33 which is open for free passage from a crevice 32 to the field of the opposite side of a substrate with a drill or ultrasonic machining is formed near the core of a glass substrate 30.

[0021] Next, as shown in drawing 4, the silicon substrate 20 produced at the process of drawing 2 and the glass substrate 30 produced at the process of drawing 3 are joined, it is processed further, and a micro capillary tube array is produced. First, as shown in drawing 4 (a), the field of the side in which the hole 21 of the silicon substrate 20 produced at the process of drawing 2 is carrying out opening, and the near field in which the crevice 32 of the glass substrate 30 produced at the process of drawing 3 was formed are doubled, and anode plate junction is carried out. Next, as shown in drawing 4 (b), TMAH etches a silicon substrate 20 greatly using the organic alkali solution contained thinly from the field 24 of the opposite side the side in which the hole 21 is carrying out opening. Since silicon oxide or silicon nitride is not etched, the hollow needle which consists of silicon oxide or silicon nitride can be made to project from a substrate so that it may illustrate. However, since silicon oxide or a silicon nitride film will also be etched little by little, the protective coat to silicon oxide or a silicon nitride film 22 is required. The glass substrate 30 joined to the field of the side in which the hole 21 of a silicon substrate 20 is carrying out opening plays the role of this protective coat. Moreover, after etching, since the thickness of a silicon substrate 20 becomes very thin, the glass substrate 30 is required also from the field of maintenance of a silicon substrate 20.

[0022] In this way, it will be in the condition that much silicon oxide or the saccate hollow needle 25 made from a silicon nitride film projected from a silicon substrate 20. However, in this phase, the saccate hollow needle 25 is an owner bottom, and only the top face has opened it wide. In addition, since silicon oxide or a silicon nitride film 22 also becomes thin gradually while etching silicon, in order to fully secure the die length of the hollow needle 25, the silicon oxide or the silicon nitride film 22 formed at the process of drawing 2 (c) must be made sufficiently thick.

[0023] It is also the same as when using thin films other than silicon oxide or silicon nitride, and etches on the conditions to which the etch rate of silicon becomes quick enough compared with the thin film quality of the material. By it, the hollow needle which consists of the thin film quality of the material can be made to be able to project from a substrate, and can be formed. As thin films other than silicon oxide or silicon nitride, there is a metal thin film formed, for example by vacuum evaporation. Then, as shown in drawing 4 (c), it considers as the capillary tube 27 which makes a hole 26 near the tip of the saccate hollow needle 25, and is open for free passage to shaft orientations. The perforating process of this saccate hollow needle 25 is explained below. FIB processing or RIE processing can be used as the approach of this perforating process.

[0024] Drawing 5 is the explanatory view of the approach of making a hole in a saccate hollow needle by FIB processing. FIB processing equipment can detect the secondary electron emitted from a sample by scanning a weak ion beam to a sample, and can observe a scan ion microscope (SIM) image. Observing the saccate hollow needle 50 with an SIM image, FIB51 irradiated by the position is strengthened, and as shown in drawing 5 (a), a hole 52 is made near the tip of the saccate hollow needle 25. According to this approach, as illustrated, the tip location of the saccate hollow needle 50 can be removed, and a hole 52 can be made in a side face. Therefore, as typically shown in drawing 5 (b), the sharpness of the point of the hollow needle 50 can be maintained and the micro capillary tube 55 which is easy to stab a cell can be formed.

[0025] Drawing 6 is the explanatory view of the approach of making a hole in a saccate hollow needle by RIE processing. In this case, a resist 63 is applied until the saccate hollow needle 25 is buried with the side which the saccate hollow needle 25 which consists of silicon oxide film 22 of a silicon substrate 20 has projected, as first shown in drawing 6 (a). Subsequently, as shown in drawing 6 (b), the silicon substrate 20 which applied the resist 63 is arranged between an electrode 66 and 67, and the resist 65 is etched by RIE. If the tip of the saccate hollow needle 25 comes out, the tip of the saccate hollow needle 25 will also be

etched with a resist 63. It etches measuring the thickness of the resist layer 63, and etching is suspended in the phase which the hole opened at the tip of the saccate hollow needle 25. In this way, as a cross section is shown in drawing 6 (c) and a perspective view is typically shown in drawing 6 (d), a hole 62 can open at a tip and the micro capillary tube 65 which was open for free passage to shaft orientations can be formed. According to RIE processing, the advantage which can make a hole at once is in many saccate hollow needles 25.

[0026] A micro capillary tube array is produced as mentioned above. This micro capillary tube array is used by the micro chamber array and the pair. A micro chamber array is a detailed tool held in a specific location so that an object cell may not escape in the case of transgenics actuation. Below, the production approach of a micro chamber array is explained.

[0027] Drawing 7 is process drawing explaining an example of the production approach of a micro chamber array. First, as shown in drawing 7 (a), the quartz substrate 70 with a thickness of about 100 micrometers is prepared, and the metal resist layers 71a and 71b are formed in a front face and a rear face. Resist layer 71a by the side of a front face removes the resist of a circular field with a diameter of about 10 micrometers in the same pitch as the array pitch of a micro capillary tube array according to the photolithography process. By fluoric acid, as shown in drawing 7 (b), anisotropic etching of the quartz substrate 70 with which these resist layers 71a and 71b were formed is carried out. After anisotropic etching termination, removal of the resist layers 71a and 71b obtains the quartz substrate with which the taper-like through tube (micro chamber) 72 was formed in the same pitch as the array pitch of a micro capillary tube array, as shown in drawing 7 (c).

[0028] Next, as shown in drawing 7 (d), the substrate glass substrate 74 which has the crevice 75 and through tube 76 which were produced at the process same with having been shown in the quartz substrate 70 with which the through tube 72 of the shape of this taper was formed at drawing 3 is pasted up. Then, as shown in drawing 7 (e), the pump connection member 77 which consists of glass or transparency plastic material is pasted up on the inferior surface of tongue of the substrate glass substrate 74. The pump connection member 77 is for making open for free passage the pump which does not illustrate the through tube 76 of the substrate glass substrate 74, and is a tabular member which has the connection 79 connected to a through tube 76 on a side face with free passage ***** 78 at the passage 78. By connecting and attracting between a connection 79 and pumps by the tube 90, as typically shown in drawing 7 (e), it can attract and hold one cell 91 at a time in the through tube 72 of the shape of a taper of the quartz substrate 70. A member 74 and a member 77 are not used as another object, but are good also as one unified member. When the quartz substrate 70 is used as a substrate of a micro chamber array, since it is transparent, a quartz substrate has the advantage that positioning using an inverted microscope is attained from the inferior surface of tongue of a substrate like the after-mentioned, and alignment becomes easy.

[0029] Drawing 8 is process drawing explaining other examples of the production approach of a micro chamber array. In this example, as shown in drawing 8 (a) as a substrate, the single crystal silicon substrate 80 of bearing (100) is used. The resist layers 81a and 81b are formed in the front face and rear face of this silicon substrate 80. According to the process of photolithography, resist layer 81a by the side of a front face removes the resist of the square shape field of diameter angle extent of 20 micrometers in the same pitch as the array pitch of a micro capillary tube array. Anisotropic etching is carried out, as it is immersed in a KOH solution and the silicon substrate 80 in which these resist layers 81a and 81b were formed is shown in drawing 8 (b). After anisotropic etching termination, removal of the resist layers 81a and 81b obtains the silicon substrate 80 in which the taper-like pit 82 was formed in the same pitch as the array pitch of a micro capillary tube array, as shown in drawing 8 (c).

[0030] Next, a resist layer is formed in the rear-face side of a silicon substrate 80 where the taper-like pit 82 was formed in the front-face side, and the resist layer of the part which corresponds just under the taper-like pit 82 is removed the diameter of about 2-5 micrometers. And by processing it by IPC-RIE by using this resist layer as a mask, as shown in drawing 8 (d), the substrate through tube 83 from the rear face of a silicon substrate 80 to the pit 82 of the shape of a surface taper is formed.

[0031] Then, as shown in drawing 8 (e), the substrate glass substrate 84 which has the crevice 85 and through tube 86 which were produced at the process same with having been shown in drawing 3 is pasted up on the silicon substrate 80 in which the through tube 83 was formed with an anode plate conjugation

method. Furthermore, the pump connection member 87 which consists of glass or transperence plastic material is pasted up on the inferior surface of tongue of the substrate glass substrate 84. The pump connection member 87 is for making an external pump open the through tube 86 of the substrate glass substrate 84 for free passage, and is a tabular member which has the passage 88 which is open for free passage to a through tube 86, and has the connection 89 which is open for free passage on a side face in the passage 88. By connecting and attracting between a connection 89 and pumps by the tube 90, as typically shown in drawing 8 (e), it can attract and hold one cell 93 at a time in the pit 82 of the shape of a taper of a silicon substrate 80. A member 84 and a member 87 are not used as another object, but are good also as one unified member.

[0032] Since the path of the through tube 83 linked to the pit 82 of the shape of a taper holding a cell 93 can be made small when a silicon substrate 80 is used as a substrate of a micro chamber array, there is an advantage that it can hold also in a small cell.

[0033] Drawing 9 is the whole example block diagram of the microinjection array system by this invention. the micro chamber array 100 and the DNA container 150 which this system consisted of with the quartz substrate -- laying -- a movable in two-dimensional direction transperence X-Y stage 110, and X-Y stage 110 top -- the micro capillary tube array 120 -- the vertical direction (Z direction) -- migration -- it has the operational manipulator 130. The micro chamber array 100 is arranged on the electrostrictive actuator 160. The pump 112 is connected to the micro chamber array 100 through the tube 111, and the syringe 122 is connected to the micro capillary tube array 120 through the tube 121. The inverted microscope 140 for alignment is arranged under X-Y stage 110. DNA impregnation actuation to the cell using the microinjection array system shown in drawing 9 is performed according to the following procedures.

[0034] (1) Carry out suction immobilization of every one cell 115 at each chamber, applying negative pressure for cell suspension with a sink and a pump 112 on a micro chamber array. The cell which was not fixed is passed away.

(2) Move X-Y stage 110 and position the DNA container 150 under the micro capillary tube array 120.

(3) A manipulator 130 is operated, the micro capillary tube array 120 is moved caudad, and it is immersed into the solution of the DNA container 150.

[0035] (4) Operate a syringe 122 and attract the DNA solution in the DNA container 150 to the micro capillary tube array 120. A DNA solution is attracted inside each capillary tube. By adjusting the DNA concentration in a DNA container suitably, DNA is able to be made to be attracted by all micro capillary tubes enough.

(5) A manipulator 130 is operated, move the micro capillary tube array 120 up, move X-Y stage 110, and position the micro chamber array 100 under the micro capillary tube array 120.

(6) Observing the micro chamber array 100 and the micro capillary tube array 120 from the lower part of X-Y stage 110 using an inverted microscope 140, make X-Y stage 110 move slightly, and carry out alignment of both correctly.

[0036] (7) Operate a manipulator 130, move the micro capillary tube array 120 caudad, and thrust the tip of the micro capillary tube array 120 into each cell 115 currently held at the micro chamber array 100. At this time, the actuation which stabs a cell with a micro capillary tube becomes easy by vibrating the cell 115 in which the electrostrictive actuator 160 which has carried the micro chamber array 100 is driven, and the micro chamber array 100 is adsorbed.

(8) Operate a syringe 122 in the condition that the micro capillary tube of the micro capillary tube 120 is pierced in each cell 115 in which the micro chamber array 100 is adsorbed, and inject DNA in a micro capillary tube into a cell 115.

[0037] (9) the direction which operates a manipulator 130, moves the micro capillary tube array 120 up, and shows X-Y stage 110 to drawing 10 by the arrow head -- moving -- the new cell of another block of the micro chamber array 100 -- the micro capillary tube array 120 -- caudad -- positioning .

(10) Perform DNA impregnation actuation to all the cells in which the micro chamber array 100 is adsorbed, repeating actuation of (9) from the above (6) and filling up DNA from the DNA container 150 if needed.

(11) Give positive pressure to a micro chamber array by carrying out the inversion drive of the pump 112, cancel suction immobilization of a cell, and collect the cells into which DNA was injected, after performing

DNA impregnation into all cells. By such actuation, DNA can be separately poured in certainly to a lot of cells.

[0038] Moreover, a micro capillary tube can be thrust into the cell 115 held to the micro chamber array 100, and the matter which contains a nucleus by pouring in the matter which held other cells to the micro chamber array 110, pierced the micro capillary tube, and was attracted in the capillary tube after attracting the matter containing an intracellular nucleus can be transplanted between cells. Although it can also work in that case, exchanging cells by one micro chamber array 100, working efficiency can be raised, if another micro chamber array is placed on X-Y stage 110 instead of the DNA container 150 of drawing 9 and it works in the above-mentioned procedure.

[0039] In addition, in the example shown in drawing 9, positioning of the micro chamber array 100 and the micro capillary tube array 120 was performed using the inverted microscope 140 from the lower part of transparent X-Y stage 110. However, the positioning approach of a micro chamber array and a micro capillary tube array is not limited only to the approach which used the inverted microscope. For example, as shown in drawing 11, the alignment mark 102 is formed every block 101 of the micro chamber array 100, and both alignment can also be performed by checking an alignment mark 102 under the erection microscope installed in the micro capillary tube array side. Or it is also possible to carry out without needing a check according a micro chamber array and micro capillary tube array alignment to a microscope by using an X-Y stage with a high delivery precision.

[0040] Moreover, in the system shown in drawing 9, DNA was poured in in order for every block of a micro chamber array, setting up the number of the capillary tubes of 120 in a micro capillary tube array fewer than the number of chambers in the micro chamber array 100, and moving the micro chamber array 100 relatively to the micro capillary tube array 120. However, DNA can be injected into all the cells once held by actuation at the micro chamber array if the number of the capillary tubes in a micro capillary tube array and the number of chambers in a micro chamber array are set up equally.

[0041] Moreover, although the micro chamber array 100 is moved in X and the direction of Y and it was made to drive the micro capillary tube array 120 in the vertical direction (Z direction) in the system shown in drawing 9, it is the micro chamber array's 100 considering as immobilization, and making the micro capillary tube array 120 movable also in X and the direction of Y with the vertical direction, and, of course, it is also possible to perform DNA impregnation into all the cells by which suction immobilization was carried out at the micro chamber array 100.

[0042] In the impregnation trial for which the rate of prehension of one cell used the fluorochrome 30% in the experiment using a poplar protoplast with the equipment by this invention incorporating 300-micrometer spacing, the micro capillary tube array of 50x50 arrays, and a micro chamber array, the injection ratio was 30%. Therefore, the matter was able to be once injected into about 200 cells by actuation. Business time amount is about 1 minute. In the conventional microinjection method, it means that processing effectiveness had improved about 200 times by this invention as compared with the conventional method since a limit performed impregnation processing to one cell by the almost same time amount.

[0043]

[Effect of the Invention] According to this invention, it becomes possible to produce the micro capillary tube array for injecting the matter into a cell, and it becomes possible by using the micro capillary tube array to introduce the matter separately certainly to a lot of cells.

[Translation done.]

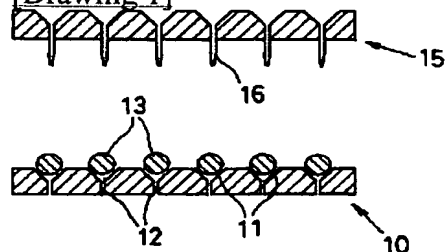
* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

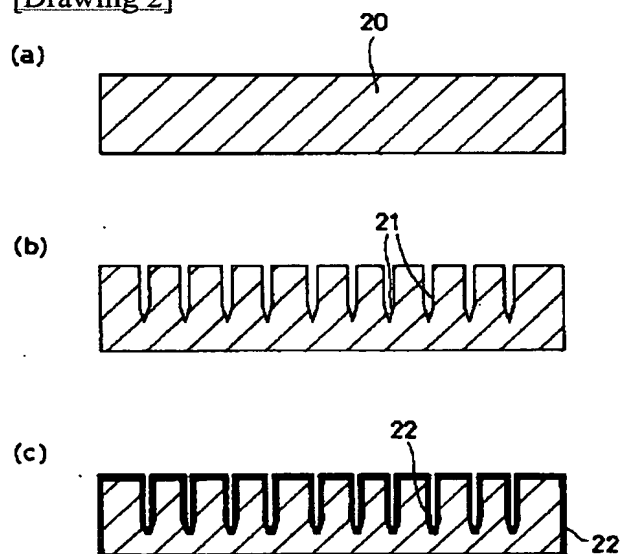
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

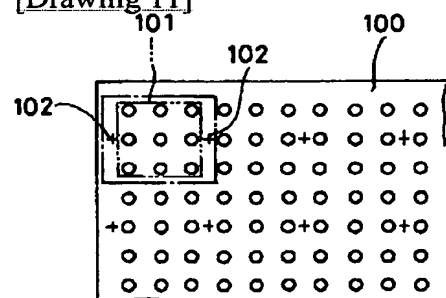
[Drawing 1]



[Drawing 2]

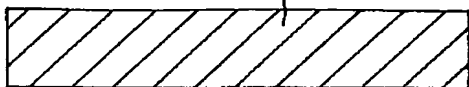


[Drawing 11]

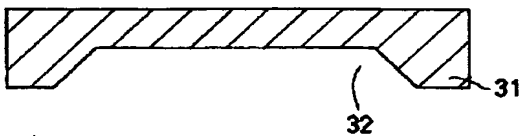


[Drawing 3]

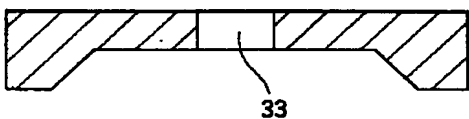
(a)



(b)

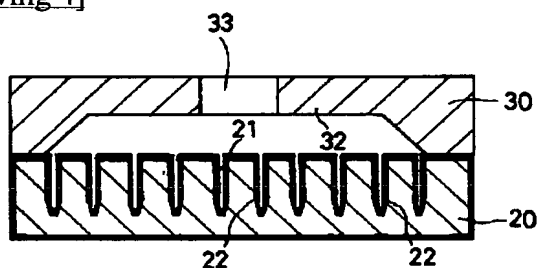


(c)

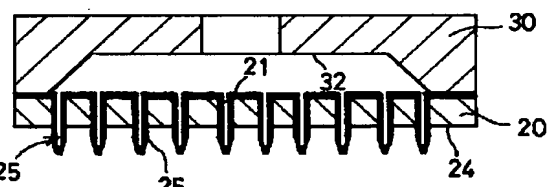


[Drawing 4]

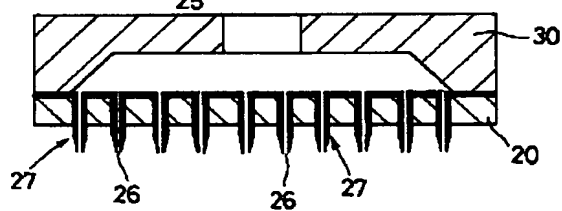
(a)



(b)

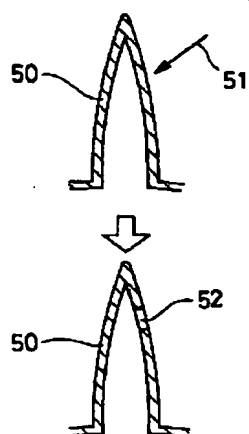


(c)

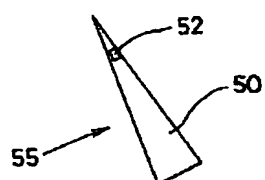


[Drawing 5]

(a)

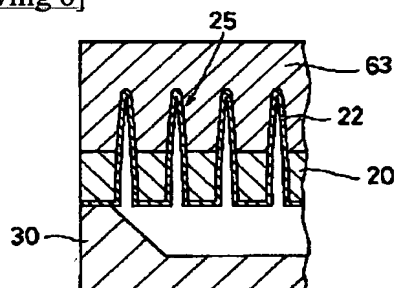


(b)

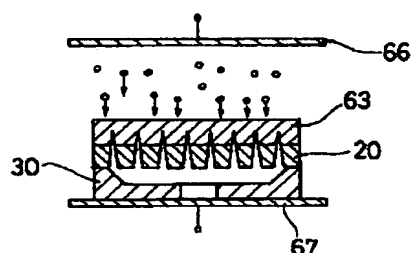


[Drawing 6]

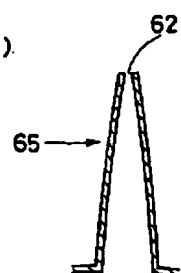
(a)



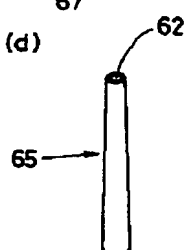
(b)



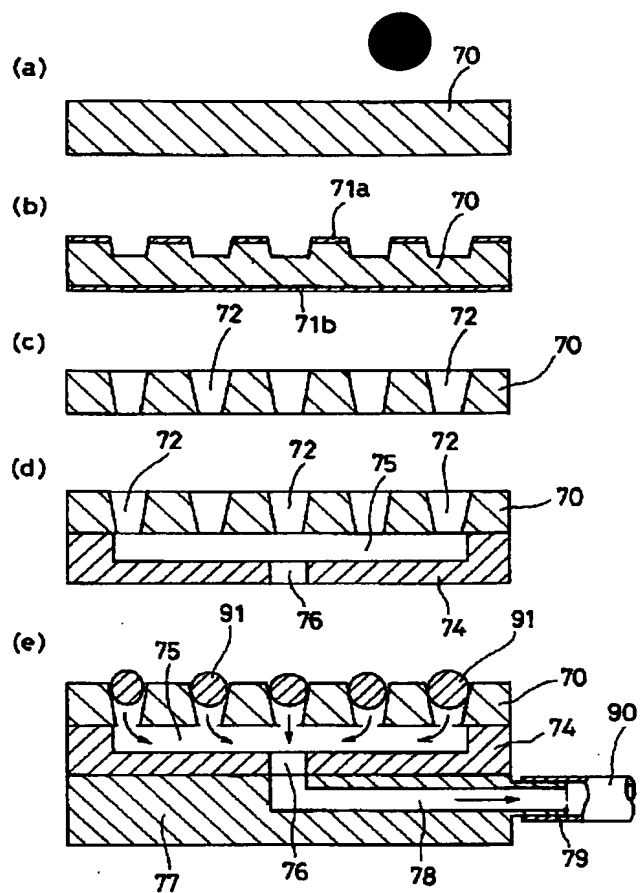
(c)



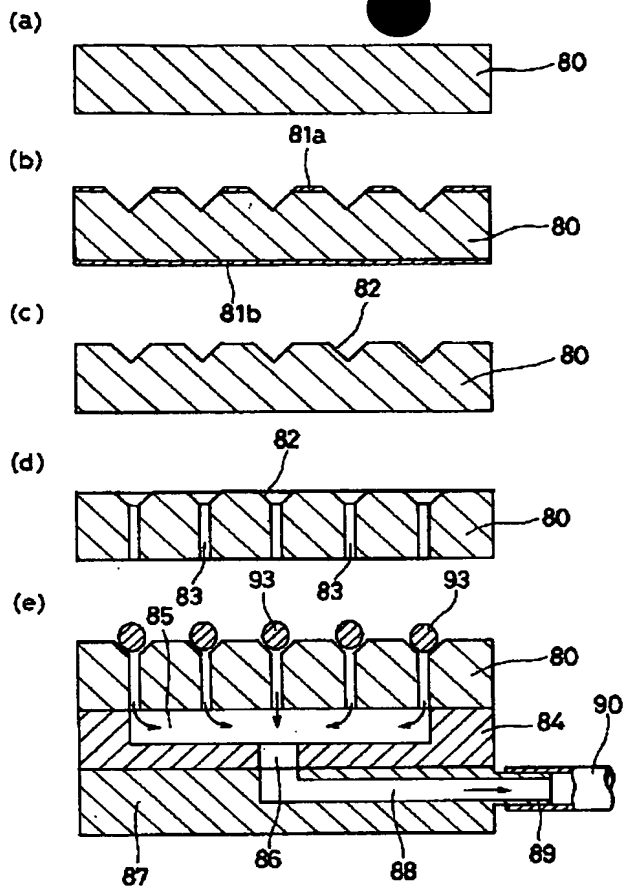
(d)



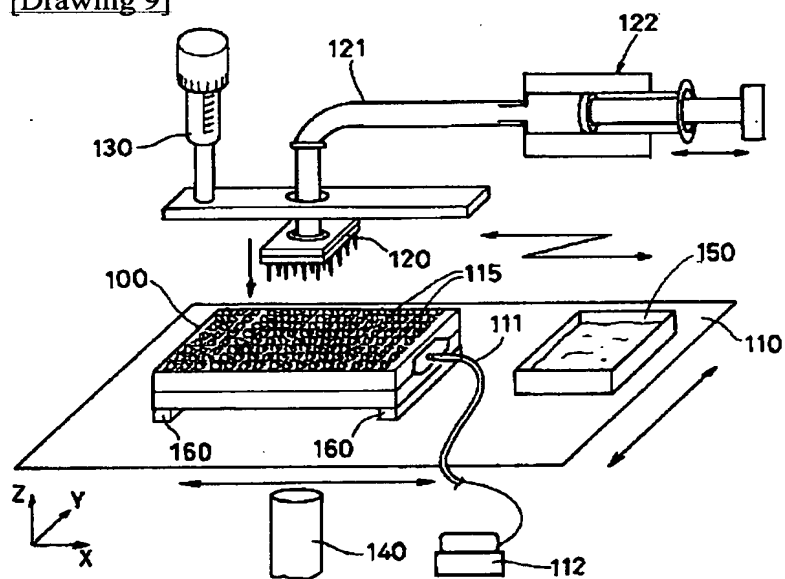
[Drawing 7]



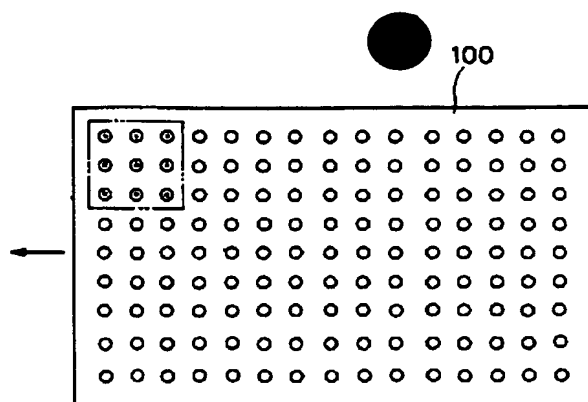
[Drawing 8]



[Drawing 9]



[Drawing 10]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-23657

(P2000-23657A)

(43) 公開日 平成12年1月25日 (2000.1.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10			Z 4 B 0 2 9
15/09		G 0 1 N 1/00	1 0 1 K 4 B 0 6 5
G 0 1 N 1/00	1 0 1	C 1 2 N 5/00	B
			C

審査請求 有 請求項の数11 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-193931

(22) 出願日 平成10年7月9日 (1998.7.9)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年1月23日～25日 日本機械学会・バイオ エンジニアリング部門主催の「日本機械学会100周年記念第10回バイオエンジニアリング講演会」において文書をもって発表

(71) 出願人 591031360

農林水産省食品総合研究所長

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72) 発明者 菊池 佑二

茨城県竜ヶ崎市長保台4-1-10-2-506

(72) 発明者 全 教錫

東京都世田谷区上祖師谷4-24-1 祖師谷留学生会館C-106

(72) 発明者 年吉 洋

神奈川県中郡二宮町中里2-16-36

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

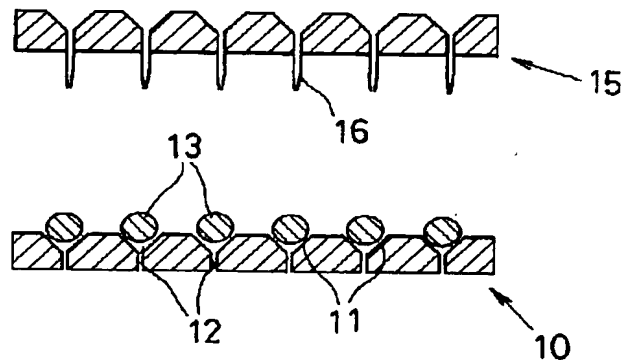
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロキャピラリーアレイ、その製造方法、及び物質注入装置

(57) 【要約】

【課題】 細胞を個別的にかつ正確にハンドリングすることのできる操作ツールを提供する。

【解決手段】 マイクロチャンバーアレイ10と、マイクロキャピラリーアレイ15を用いる。マイクロチャンバー11は表面から窪んだピットとピットの底部に連通する連通孔12からなり、各チャンバー11に細胞13を一個ずつ負圧吸引固定する。マイクロキャピラリーアレイ15は、マイクロチャンバー11の配列と同じ配列でアレイ状に並べて形成された外形1～2μm程度の先端を有する多数のマイクロキャピラリー16を備え、そのマイクロキャピラリー16を用いて、マイクロチャンバー11に保持されたすべての細胞13に対してDNA注入を一括して行なう。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 外径 2 ～ 10 μm の複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 2】 基板表面に形成される薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、前記基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 3】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンであることを特徴とする請求項 2 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 4】 前記中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通していることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 5】 基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、
前記穴の内壁に薄膜を形成する工程と、
前記穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、
前記薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 6】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 5 記載のマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 7】 基板の一方の表面から内部に向かって所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、
前記複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、
前記細穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、
前記薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 8】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 7 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 9】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工によって行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 10】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は ICP・RIE 加工によって行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 11】 前記基板はシリコン基板であり、前記

薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンからなることを特徴とする請求項 5 ～ 10 のいずれか 1 項記載のマイクロキャピラリーアレイの作成方法。

【請求項 12】 複数の細胞を所定のピッチ配列で保持する細胞保持手段と、
先端が基板から突出した外径 2 ～ 10 μm の複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で備えるマイクロキャピラリーアレイと、
前記マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、
前記細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする物質注入装置。

【請求項 13】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、
前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイに物質を吸引するステップと、
前記物質を吸引したマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、
キャピラリー中の物質を細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

【請求項 14】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、
前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、
キャピラリーを突き刺された細胞中の物質をキャピラリー中に吸引するステップと、
キャピラリー中に吸引された物質を他の細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

【請求項 15】 請求項 13 又は 14 記載の方法によって物質を注入された細胞及びその細胞から分裂増殖した細胞。

【請求項 16】 請求項 13 又は 14 記載の方法によって物質を注入された細胞から分裂増殖して得られた成体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞に遺伝子等を注入するのに使用されるマイクロインジェクションアレイシステムと、それに使用されるマイクロキャピラリーアレイ及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、生物学、医学、薬学、生化学、遺伝子工学などを基礎として急速に進歩しつつあるいわゆるバイオテクノロジーの研究と開発は、日進月歩のスピードで進んでおり、組織や細胞レベルでの研究から DNA レベルでの生物機能の解明へと進展している。なかでも、将来バイオテクノロジーの応用面で中核技術と目さ

れている遺伝子組換えDNA技術は、当初の微生物を対象とした医薬品生産から発展し、農作物、家畜などの高等動植物の改良、食品素材や化学品の生産、遺伝子治療、さらには動物複製 (cloning) など広範多岐にわたった研究開発が進められている。このようなバイオテクノロジーの研究では、細胞、核、染色体、DNA、タンパクなどの生体高分子のハンドリングに対するニーズが高く、また生物の持っている優れた機能を工学的にあるいは産業的に応用しようとする試みも数多くなされている。

【0003】細胞にDNA等の物質を注入する方法としては、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法、膜融合法などが知られている。エレクトロポレーション法は、細胞に電場パルスをかけてその細胞を一時的に透過性にする方法である。パーティクルガン法は、DNA等の物質を付着させた金属粒子を加速して細胞に当て、細胞内に打ち込む方法、マイクロインジェクション法は細胞にマイクロキャピラリーを刺入してDNA等の物質を注入する方法、膜融合法は物質を封入したリポソーム等をポリエチレングリコール等の化学物質を用いて細胞膜に融合させ細胞と一体化させる方法である。細胞は数 μm から数十 μm とマイクロメータサイズの大きさを持つので、これらの微細な対象を上手に扱うには、対象にあわせた微細なツールが必要となる。細胞に遺伝子を注入するツールとしては、上記の方法が用いられている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】バイオテクノロジーの研究に当っては細胞に遺伝子を注入することから作業が始まるが、現在まで、多数の細胞に効率よく遺伝子を注入することの出来る方法あるいはツールは開発されていない。前述のエレクトロポレーション法は、細胞を個別的ではなく集団として扱って注入を行う方法であるため、細胞の無駄遣いが多く、また遺伝子導入操作の効率が非常に悪いという問題があった。パーティクルガン法も同様である。マイクロインジェクション法は確実に遺伝子導入を行える方法ではあるが、一回に一個の細胞にしか遺伝子導入ができないので遺伝子導入操作の効率が非常に悪いという問題があった。

【0005】本発明は、このように細胞を個別的にかつ正確にハンドリングできる操作ツールや操作技術が確立されていない現状に鑑みてなされたもので、細胞を個別的にかつ正確にハンドリングすることのできる操作ツールを提供することを目的とする。本発明は、また、個別操作の特性を保持した上で大量の細胞を処理することのできる処理方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、半導体デバイスの製造などに用いられている微細加工技術を利用して微細キャピラリーをアレイ化することにより、細胞の個

別的な操作と同時に多くの細胞を対象として遺伝子導入操作の一括処理が可能なマイクロインジェクションアレイシステムを開発し、遺伝子導入作業の効率向上を図るものである。

【0007】図1は、本発明のマイクロインジェクションアレイシステムによる遺伝子注入法の概念図である。本発明のマイクロインジェクションアレイシステムは、マイクロチャンバーアレイ10とマイクロキャピラリーアレイ15を備える。マイクロチャンバーアレイ10は、一個一個の細胞13を個別に保持することのできる多数のマイクロチャンバー11を備える。マイクロチャンバー11は表面から窪んだピットとピットの底部に連通する連通孔12からなり、ピットの大きさを細胞13の直径より少し小さめに作れば、一個の細胞だけの捕捉が可能となる。細胞捕捉の時は、マイクロチャンバー11の上に細胞が入った浮遊液を流し、そして連通孔12を介して背後からピットに陰圧をかけてやると一つのチャンバー11に一個の細胞13が負圧吸引固定される。マイクロチャンバーをアレイ化することにより、多くの細胞を一括してアレイ状に配列、固定することができる。

【0008】マイクロキャピラリーアレイ15は、マイクロチャンバー11の配列と同じ配列でアレイ状に並べて形成された外径2~10 μm 程度の先端を有する多数のマイクロキャピラリー16を備え、そのマイクロキャピラリー16を用いて、マイクロチャンバー11に保持されたすべての細胞13に対してDNA等の物質注入を一括して行なう。本発明によるマイクロキャピラリーアレイは、外径2~10 μm の複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とする。

【0009】本発明によるマイクロキャピラリーアレイは、また、基板表面に形成される薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とする。基板はシリコン基板とすることができ、薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンとすることができ、中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通しているのが好ましい。

【0010】本発明によるマイクロキャピラリーの作製方法は、基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、穴の内壁に薄膜を形成する工程と、穴を加工した表面と反対側の表面から基板をエッチングして細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とする。先端部を開口させる工程では、中空構造の最先端部を残して開口させるのが好ましい。

【0011】本発明によるマイクロキャピラリーアレイの作製方法は、また、基板の一方の表面から内部に向か

って所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、細穴を加工した表面と反対側の表面から基板をエッチングして細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とする。先端部を開口させる工程では、中空構造の最先端部を残して開口させるのが好ましい。複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工、あるいはICP・RIE加工によって行うことができる。

【0012】基板はシリコン基板とすることができ、薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンで形成することができる。薄膜は、蒸着等の方法で形成した金属薄膜としてもよい。本発明による物質注入装置は、複数の細胞を所定のピッチ配列で保持する細胞保持手段と、先端が基板から突出した外径2~10 μ mの複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で備えるマイクロキャピラリーアレイと、マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする。

【0013】また、本発明による物質注入方法は、複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイに物質を吸引するステップと、物質を吸引したマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、キャピラリー中の物質を細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする。

【0014】本発明による物質注入方法は、また、複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、キャピラリーを突き刺された細胞中の物質をキャピラリー中に吸引するステップと、キャピラリー中に吸引された物質を他の細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする。本発明は、また、前述の方法によって物質を注入された細胞及びその細胞から分裂増殖した細胞である。本発明は、また、前述の方法によって物質を注入された細胞から分裂増殖して得られた成体である。

【0015】本発明の物質注入装置あるいは物質注入方法は、細胞にDNAや蛋白質等の生体高分子、標識用の蛍光色素等を注入するために利用することができ、動植物の人工的改良・育種に利用することができる。本発明によると、遺伝子導入機構のアレイ化により、多くの細胞を対象とした遺伝子導入操作が可能となり、作業効率やDNA導入効率を大幅に向上することができる。また、本発明の遺伝子注入法は、直接注入方式であるため、他の方式と比べ遺伝子導入を確実に行うことができる。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。最初に、図2~図4を用いてマイクロキャピラリーアレイの作製方法について説明する。図2は、マイクロキャピラリーが形成されるシリコン基板の加工工程を示すものである。図2(a)のように、例えば厚さ200~400 μ m程度のシリコン基板20を用意し、それに図2(b)に示すように、2~10 μ m程度の外径を有し、50 μ m以上の深さを有する多数の穴21を格子状に整列させて形成する。この穴21を形成する工程は、例えば集束イオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)を用いた加工によって、あるいは高密度プラズマエッチング(Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching: ICP-RIE)によって行うことができる。

【0017】FIBによる加工は、シリコン基板20を精密ステージでステップ的に移動させながら穴21を1個ずつ開けるため、加工に時間を要するものの、穴の先端部が尖った構造を形成することができる。その結果、後述の工程を経て、先端部の曲率半径が約0.1 μ mと鋭く尖ったマイクロキャピラリーを作製することができる。遺伝子導入用のキャピラリー構造としては当然ながら先端部が鋭く尖った方が望ましい。

【0018】また、ICP-RIEによる加工は、シリコン基板表面に塗布したフォトリソグロフ工程によって穴のパターンを形成し、そのフォトリソグロフをマスクとして反応性イオンの高密度プラズマによるエッチングで穴を形成するものである。ICP-RIE法は、短時間の処理で多数の穴を一度に形成することができるが、FIB加工のように穴の先端を細くすることができない。

【0019】穴を形成したシリコン基板20に対して、その後、熱酸化、ヘビードープ、気相堆積法、スパッタリング等の方法を用いて薄膜形成を行う。例えば、図2(c)に示すように、全面を酸化させて、穴21の内壁部分も含めて酸化シリコン(SiO₂)膜22で覆う。基板表面及び穴21の内壁への酸化シリコン膜22の形成は、例えば酸素雰囲気中でシリコン基板を1150℃程度に加熱することで行うことができる。1時間の加熱で0.2 μ m程度の厚さの酸化膜が形成され、10時間の加熱で1 μ m程度の厚さの酸化膜を形成することができる。最終的に形成されるマイクロキャピラリーの強度を確保するためには、酸化シリコン膜22の膜厚は1 μ m程度とする必要がある。酸化シリコン膜に代えて窒化シリコン膜を形成する場合には、低圧気相堆積法(LP-CVD)でSiH₄とアンモニアを混合して800℃で反応させることにより形成することができる。

【0020】次に、図3に示すように、ガラス基板を加工する。図3(a)に示すように、厚さ0.5mm程度のガラス基板30を用意する。そのガラス基板30をクロム・金をレジストとしてフッ酸中でエッチングするこ

とにより、図3(b)に示すように、片面に周縁部31を残して凹部32を形成して、皿状に加工する。更に、図3(c)に示すように、ガラス基板30の中心付近に、ドリルあるいは超音波加工によって凹部32から基板の反対側の面まで連通する貫通孔33を形成する。

【0021】次に、図4に示すように、図2の工程で作製したシリコン基板20と、図3の工程で作製したガラス基板30とを接合し、更に加工してマイクロキャピラリーアレイを作製する。まず、図4(a)に示すように、図2の工程で作製したシリコン基板20の穴21が開口している側の面と、図3の工程で作製したガラス基板30の凹部32が形成された側の面を合わせ、陽極接合する。次に、図4(b)に示すように、シリコン基板20を、穴21が開口している側と反対側の面24からTMAHが薄く含まれている有機アルカリ溶液を用いて大きくエッチングする。酸化シリコンあるいは窒化シリコンはエッチングされないので、図示するように、酸化シリコンあるいは窒化シリコンからなる中空針を基板から突出させることができる。しかしながら、酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜も少しずつエッチングされてしまうので、酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜22に対する保護膜が必要である。シリコン基板20の穴21が開口している側の面に接合したガラス基板30は、この保護膜の役割を果たす。また、エッチング後、シリコン基板20の厚さが非常に薄くなるので、シリコン基板20の保持の面からもガラス基板30は必要である。

【0022】こうして、シリコン基板20から多数の酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜製の袋状中空針25が突出した状態となる。ただし、この段階では袋状中空針25は有底であり、上面のみが開放している。なお、シリコンをエッチングしていく間に酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜22も次第に薄くなっていくので、中空針25の長さを十分に確保するためには、図2(c)の工程で形成する酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜22を充分厚くしておかなければならない。

【0023】酸化シリコンあるいは窒化シリコン以外の薄膜を用いる場合も同様であり、薄膜材質に比べてシリコンのエッチング速度が十分に速くなる条件でエッチングを行う。それによって、薄膜材質からなる中空針を基板から突出させて形成することができる。酸化シリコンあるいは窒化シリコン以外の薄膜としては、例えば蒸着によって形成した金属薄膜などがある。続いて、図4

(c)に示すように、袋状中空針25の先端付近に穴26を開けて軸方向に連通するキャピラリー27とする。この袋状中空針25の穴開け加工について、次に説明する。この穴開け加工の方法としては、FIB加工あるいはRIE加工を利用することができる。

【0024】図5は、FIB加工によって袋状中空針に穴を開ける方法の説明図である。FIB加工装置は、試料に対して弱いイオンビームを走査することで試料から

放出される二次電子を検出して走査イオン顕微鏡(SIM)像を観察することができる。SIM像によって袋状中空針50を観察しながら、所定の位置で照射するFIB51を強くして、図5(a)に示すように袋状中空針25の先端付近に穴52を開ける。この方法によると、図示したように袋状中空針50の先端位置を外して側面に穴52を開けることができる。そのため、図5(b)に模式的に示すように、中空針50の先端部の鋭さを維持することができ、細胞に刺しやすいマイクロキャピラリー55を形成することができる。

【0025】図6は、RIE加工によって袋状中空針に穴を開ける方法の説明図である。この場合には、まず図6(a)に示すように、シリコン基板20の酸化シリコン膜22からなる袋状中空針25が突出している側に、袋状中空針25が埋まるまでレジスト63を塗布する。次いで、図6(b)に示すように、レジスト63を塗布したシリコン基板20を電極66、67間に配置して、RIEでレジスト65をエッチングしていく。袋状中空針25の先端が出ると、レジスト63とともに袋状中空針25の先端もエッチングする。レジスト層63の厚さを計測しながらエッチングしていき、袋状中空針25の先端に穴が開いた段階でエッチングを停止する。こうして図6(c)に断面模式図を示し、図6(d)に模式的に斜視図を示すように、先端に穴62が開いて、軸方向に連通したマイクロキャピラリー65を形成することができる。RIE加工によると、多数の袋状中空針25に一度に穴を開けることができる利点がある。

【0026】以上のようにして、マイクロキャピラリーアレイが作製される。このマイクロキャピラリーアレイは、マイクロチャンバーアレイと対で用いられる。マイクロチャンバーアレイは、遺伝子導入操作の際に対象細胞が逃げないように特定の場所に保持する微細ツールである。以下に、マイクロチャンバーアレイの作製方法を説明する。

【0027】図7は、マイクロチャンバーアレイの作製方法の一例を説明する工程図である。まず、図7(a)に示すように、厚さ約100 μ mの石英基板70を用意し、表面及び裏面に金属レジスト層71a、71bを形成する。表面側のレジスト層71aはフォトリソグラフィ工程により、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチで直径10 μ m程度の円形領域のレジストを除去しておく。このレジスト層71a、71bが形成された石英基板70をフッ酸で図7(b)に示すように異方性エッチングする。異方性エッチング終了後、レジスト層71a、71bを除去すると、図7(c)に示すように、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチでテーパ状の貫通孔(マイクロチャンバー)72が形成された石英基板が得られる。

【0028】次に、図7(d)に示すように、このテーパ状の貫通孔72が形成された石英基板70に、図3に

示したのと同様の工程で作製された凹部75及び貫通孔76を有する下地ガラス基板74を接着する。その後、図7(e)に示すように、下地ガラス基板74の下面にガラスもしくは透明プラスチック材料からなるポンプ接続部材77を接着する。ポンプ接続部材77は、下地ガラス基板74の貫通孔76を図示しないポンプに連通させるためのものであり、貫通孔76に連通する流路78と、側面にその流路78に接続する接続部79を有する板状の部材である。接続部79とポンプの間をチューブ90で接続して吸引することにより、図7(e)に模式的に示すように、細胞91を1個ずつ石英基板70のテーパ状の貫通孔72の中に吸引して保持することができる。部材74と部材77は別体とせず、一体化した1つの部材としても良い。マイクロチャンバーアレイの基板として石英基板70を用いると、石英基板は透明であるため、後述のように基板の下面から倒立顕微鏡を用いた位置決めが可能となり、位置合わせが容易になるという利点がある。

【0029】図8は、マイクロチャンバーアレイの作製方法の他の例を説明する工程図である。この例では、基板として図8(a)に示すように、(100)方位の単結晶シリコン基板80を用いる。このシリコン基板80の表面及び裏面にレジスト層81a、81bを形成する。表面側のレジスト層81aはフォトリソグラフィの工程により、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチで直径20 μ m角程度の角形領域のレジストを除去しておく。このレジスト層81a、81bを形成したシリコン基板80をKOH溶液に浸漬して、図8(b)に示すように異方性エッチングする。異方性エッチング終了後、レジスト層81a、81bを除去すると、図8(c)に示すように、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチでテーパ状のピット82が形成されたシリコン基板80が得られる。

【0030】次に、表面側にテーパ状のピット82が形成されたシリコン基板80の裏面側にレジスト層を形成し、テーパ状のピット82の真下に相当する部分のレジスト層を直径2~5 μ m程度除去する。そして、このレジスト層をマスクとしてIPC-RIEで加工することにより、図8(d)に示すように、シリコン基板80の裏面から表面のテーパ状のピット82に至る基板貫通孔83を形成する。

【0031】続いて、図8(e)に示すように、貫通孔83が形成されたシリコン基板80に、図3に示したのと同様の工程で作製された凹部85及び貫通孔86を有する下地ガラス基板84を陽極接合法により接着する。更に、下地ガラス基板84の下面にガラスもしくは透明プラスチック材料からなるポンプ接続部材87を接着する。ポンプ接続部材87は、下地ガラス基板84の貫通孔86を外部のポンプに連通させるためのものであり、貫通孔86に連通する流路88を有し、側面にその流路

88に連通する接続部89を有する板状の部材である。接続部89とポンプの間をチューブ90で接続して吸引することにより、図8(e)に模式的に示すように、細胞93を1個ずつシリコン基板80のテーパ状のピット82の中に吸引して保持することができる。部材84と部材87は別体とせず、一体化した一つの部材としても良い。

【0032】マイクロチャンバーアレイの基板としてシリコン基板80を用いた場合には、細胞93を保持するテーパ状のピット82に接続する貫通孔83の径を小さくできるため、小さな細胞でも保持することができるという利点がある。

【0033】図9は、本発明によるマイクロインジェクションアレイシステムの一例の全体構成図である。このシステムは、石英基板によって構成されたマイクロチャンバーアレイ100とDNA容器150を載置して2次元方向に移動可能な透明XYステージ110、XYステージ110上でマイクロキャピラリーアレイ120を上下方向(Z方向)に移動操作可能なマニピュレータ130を備える。マイクロチャンバーアレイ100は圧電アクチュエータ160上に配置されている。マイクロチャンバーアレイ100にはチューブ111を介してポンプ112が接続されており、マイクロキャピラリーアレイ120にはチューブ121を介してシリンジ122が接続されている。XYステージ110の下方には、位置合わせのための倒立顕微鏡140が配置されている。図9に示したマイクロインジェクションアレイシステムを用いた細胞へのDNA注入操作は、以下の手順に従って行われる。

【0034】(1) マイクロチャンバーアレイ上に細胞浮遊液を流し、ポンプ112によって負圧をかけて各チャンバーに細胞115を1個ずつ吸引固定する。固定されなかった細胞は流し去る。

(2) XYステージ110を移動してDNA容器150をマイクロキャピラリーアレイ120の下方に位置決めする。

(3) マニピュレータ130を操作してマイクロキャピラリーアレイ120を下方に移動し、DNA容器150の溶液中に浸漬する。

【0035】(4) シリンジ122を操作してマイクロキャピラリーアレイ120にDNA容器150中のDNA溶液を吸引する。DNA溶液は個々のキャピラリーの内部に吸引される。DNA容器中のDNA濃度を適当に調整することにより、全てのマイクロキャピラリーにDNAが吸引されるようにすることは十分可能である。

(5) マニピュレータ130を操作してマイクロキャピラリーアレイ120を上方に移動し、XYステージ110を移動してマイクロキャピラリーアレイ120の下方にマイクロチャンバーアレイ100を位置づける。

(6) 倒立顕微鏡140を用いてXYステージ110の下

方からマイクロチャンバーアレイ100とマイクロキャピラリーアレイ120を観察しながらXYステージ110を微動させて両者を正確に位置合わせする。

【0036】(7) マニピュレータ130を操作してマイクロキャピラリーアレイ120を下方に移動し、マイクロキャピラリーアレイ120の先端をマイクロチャンバーアレイ100に保持されている個々の細胞115に突き刺す。このとき、マイクロチャンバーアレイ100を載せている圧電アクチュエータ160を駆動してマイクロチャンバーアレイ100に吸着されている細胞115を振動させることで、細胞にマイクロキャピラリーを刺す操作が容易になる。

(8) マイクロチャンバーアレイ100に吸着されている各細胞115にマイクロキャピラリー120のマイクロキャピラリーが突き刺さっている状態でシリンジ122を操作して、マイクロキャピラリー中のDNAを細胞115に注入する。

【0037】(9) マニピュレータ130を操作してマイクロキャピラリーアレイ120を上方に移動し、XYステージ110を例えば図10に矢印で示す方向に移動して、マイクロチャンバーアレイ100の別のブロックの新しい細胞をマイクロキャピラリーアレイ120の下方に位置づける。

(10) 前記(6)から(9)の操作を繰り返し、必要に応じてDNA容器150からDNAを補充しながら、マイクロチャンバーアレイ100に吸着されている全ての細胞に対してDNA注入操作を行う。

(11) すべての細胞にDNA注入を行った後、ポンプ112を逆転駆動することでマイクロチャンバーアレイに正圧を与えて細胞の吸引固定を解除し、DNAが注入された細胞を回収する。このような操作により、大量の細胞に対して個々に確実にDNAを注入することができる。

【0038】また、マイクロチャンバーアレイ100に保持した細胞115にマイクロキャピラリーを突き刺し、細胞内の核を含む物質を吸引した後、マイクロチャンバーアレイ110に他の細胞を保持し、マイクロキャピラリーを突き刺してキャピラリー中に吸引した物質を注入することで、核を含む物質を細胞間で移植することができる。その際、1つのマイクロチャンバーアレイ100で細胞を交換しながら作業を行うこともできるが、図9のDNA容器150の代わりにXYステージ110上にもう一つのマイクロチャンバーアレイを置いて上記の手順で作業を行えば、作業効率を高めることができる。

【0039】なお、図9に示した例では、マイクロチャンバーアレイ100とマイクロキャピラリーアレイ120の位置決めを、透明なXYステージ110の下方から倒立顕微鏡140を用いて行った。しかし、マイクロチャンバーアレイとマイクロキャピラリーアレイの位置決め方法は倒立顕微鏡を用いた方法だけに限定されるもの

ではない。例えば、図11に示すように、マイクロチャンバーアレイ100のブロック101毎に位置合わせマーク102を設けておき、マイクロキャピラリーアレイ側に設置された正立顕微鏡で位置合わせマーク102を確認することで両者の位置合わせを行うこともできる。あるいは、送り精度の高いXYステージを用いることで、マイクロチャンバーアレイとマイクロキャピラリーアレイ位置合わせを顕微鏡による確認を必要とせずに行うことも可能である。

10 【0040】また、図9に示したシステムでは、マイクロキャピラリーアレイ中120のキャピラリーの数をマイクロチャンバーアレイ100中のチャンバー数より少なく設定し、マイクロキャピラリーアレイ120に対してマイクロチャンバーアレイ100を相対的に移動させながら、マイクロチャンバーアレイのブロック毎に順番にDNAを注入した。しかし、マイクロキャピラリーアレイ中のキャピラリーの数とマイクロチャンバーアレイ中のチャンバー数とを等しく設定すると、一度の操作でマイクロチャンバーアレイに保持された全ての細胞にDNAを注入することができる。

20 【0041】また、図9に示したシステムでは、マイクロチャンバーアレイ100をX、Y方向に移動させ、マイクロキャピラリーアレイ120を上下方向(Z方向)に駆動するようにしたが、マイクロチャンバーアレイ100は固定とし、マイクロキャピラリーアレイ120を上下方向と共にX、Y方向にも移動可能とすることで、マイクロチャンバーアレイ100に吸引固定されたすべての細胞にDNA注入を行うことも勿論可能である。

30 【0042】300 μ m間隔、50 \times 50配列のマイクロキャピラリーアレイ、マイクロチャンバーアレイを組み込んだ本発明による装置で、ポプラプロトプラストを用いた実験では、細胞1個の捕捉率は30%、蛍光色素を用いた注入試験では注入率は30%であった。従って、一度の操作で約200個の細胞に物質を注入することができた。所用時間は約1分である。従来のマイクロインジェクション法では、ほぼ同じ時間で1個の細胞への注入処理を行うのが限度であるから、本発明によって処理効率が従来法に比較して約200倍向上したことになる。

40 【0043】

【発明の効果】本発明によると、細胞に物質を注入するためのマイクロキャピラリーアレイを作製することが可能になり、そのマイクロキャピラリーアレイを用いることにより大量の細胞に対して個々に確実に物質を導入することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のマイクロインジェクションアレイシステムによる遺伝子注入法の概念図。

50 【図2】マイクロキャピラリーが形成されるシリコン基板の加工工程を示す図。

13

【図 3】 ガラス基板加工工程の説明図。

【図 4】 シリコン基板とガラス基板を接合してマイクロキャピラリーアレイを作製する工程の説明図。

【図 5】 FIB 加工によって中空針に穴を開ける方法の説明図。

【図 6】 RIE 加工によって中空針に穴を開ける方法の説明図。

【図 7】 マイクロチャンバーアレイの作製方法の一例を説明する工程図。

【図 8】 マイクロチャンバーアレイの作製方法の他の例を説明する工程図。

【図 9】 本発明のマイクロインジェクションアレイシステムによる遺伝子注入操作を説明する概念図。

【図 10】 マイクロキャピラリーアレイとマイクロチャンバーアレイの位置関係を説明する図。

【図 11】 マイクロキャピラリーアレイとマイクロチャンバーアレイの位置合わせ方法の一例を説明する図。

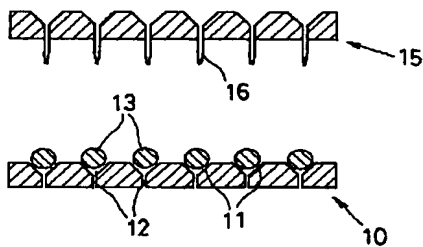
【符号の説明】

10…マイクロチャンバーアレイ、11…マイクロチャンバー、12…連通孔、13…細胞、15…マイクロキャピラリーアレイ、16…マイクロキャピラリー、20

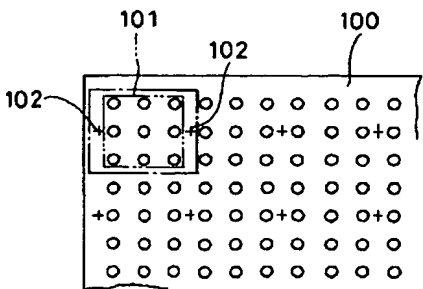
14

…シリコン基板、21…穴、22…酸化シリコン膜、25…袋状中空針、26…穴、27…キャピラリー、30…ガラス基板、31…周縁部、32…凹部、33…貫通孔、50…袋状中空針、51…FIB、52…穴、55…マイクロキャピラリー、62…穴、63…レジスト、65…マイクロキャピラリー、66、67…電極、70…石英基板、71a、71b…レジスト層、72…テーパ状の貫通孔、74…下地ガラス基板、75…凹部、76…貫通孔、77…ポンプ接続部材、78…流路、79…接続部、80…単結晶シリコン基板、81a、81b…レジスト層、82…テーパ状のビット、83…貫通孔、84…下地ガラス基板、85…凹部、86…貫通孔、87…ポンプ接続部材、88…流路、89…接続部、90…チューブ、91…細胞、93…細胞、100…マイクロチャンバーアレイ、101…ブロック、102…位置合わせマーク、110…XYステージ、111…チューブ、112…ポンプ、115…細胞、120…マイクロキャピラリーアレイ、121…チューブ、122…シリンジ、130…マニピュレータ、140…倒立顕微鏡、150…DNA容器、160…圧電アクチュエータ

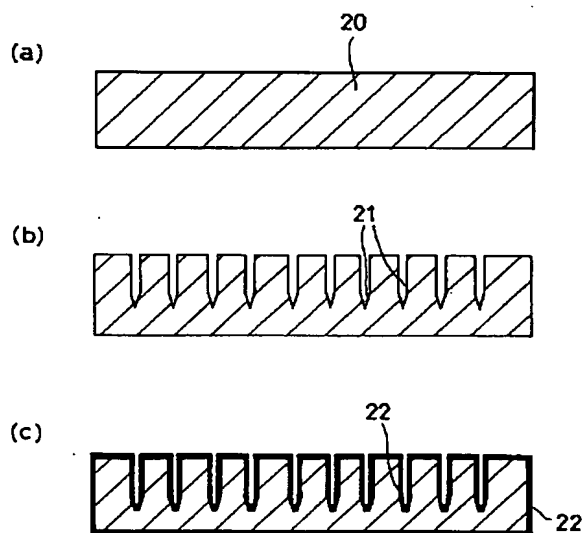
【図 1】



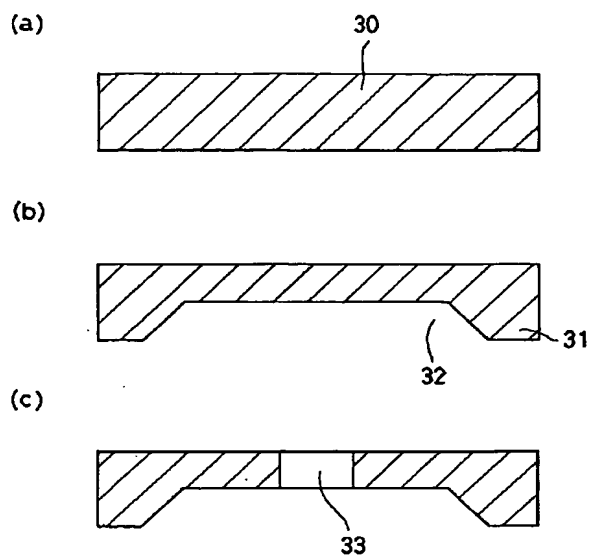
【図 11】



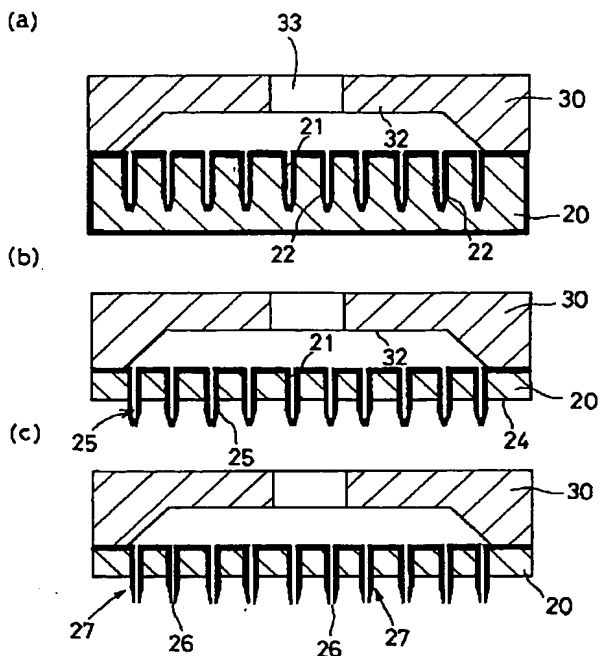
【図 2】



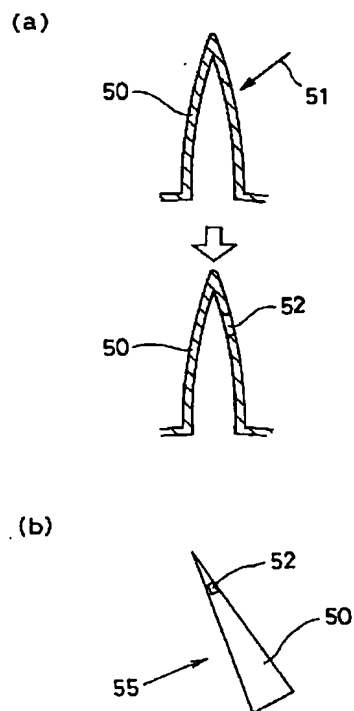
【図 3】



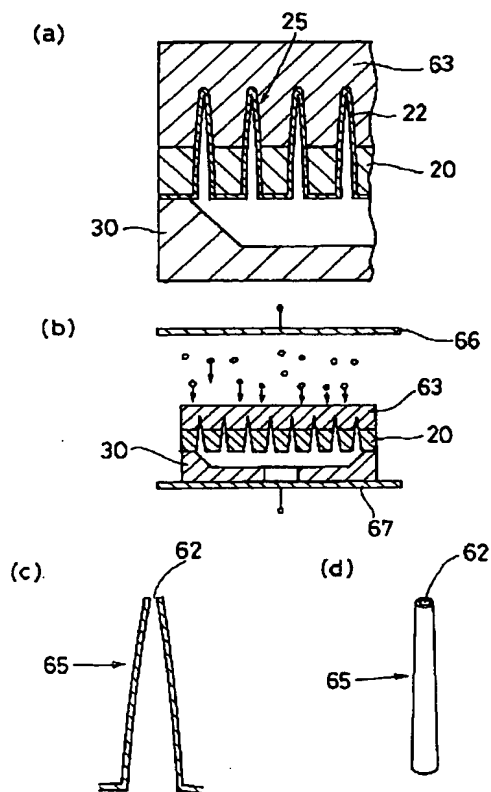
【図 4】



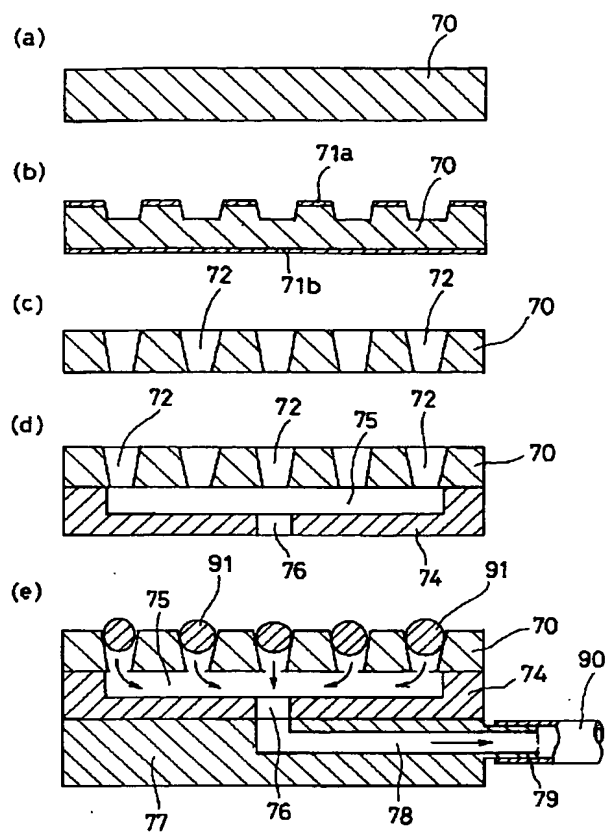
【図 5】



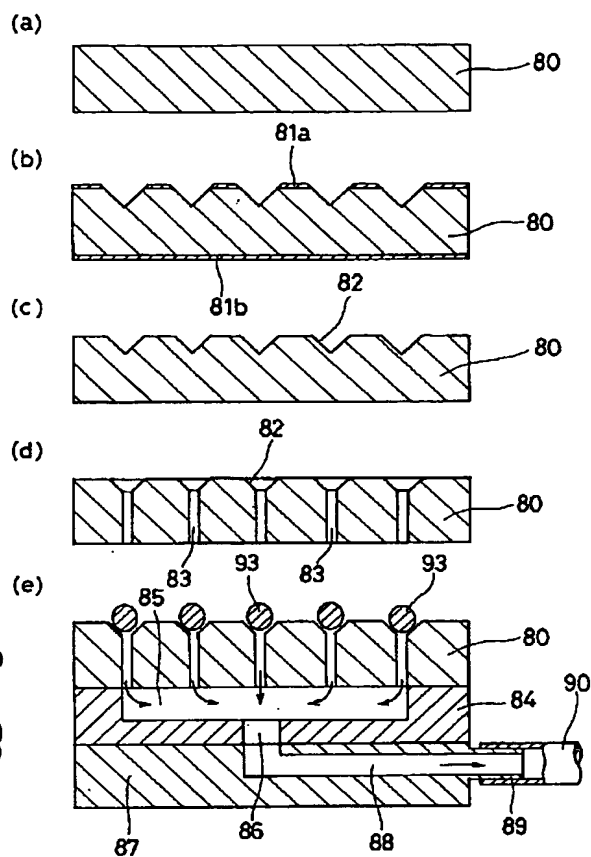
【図 6】



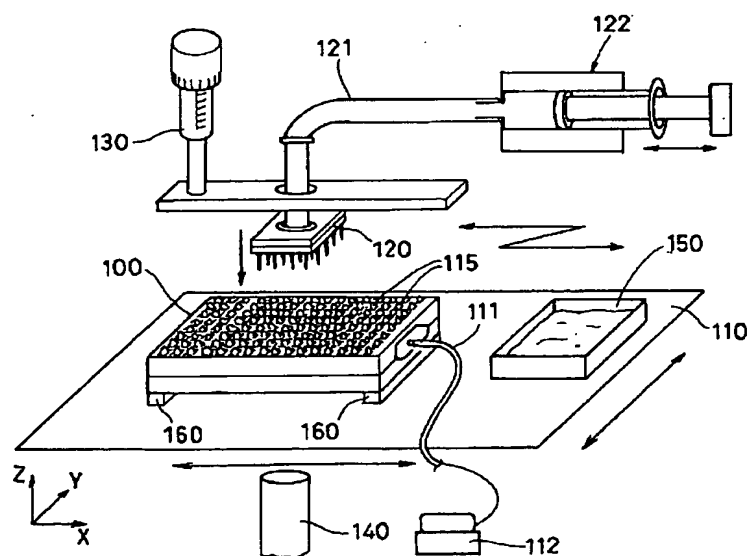
【図 7】



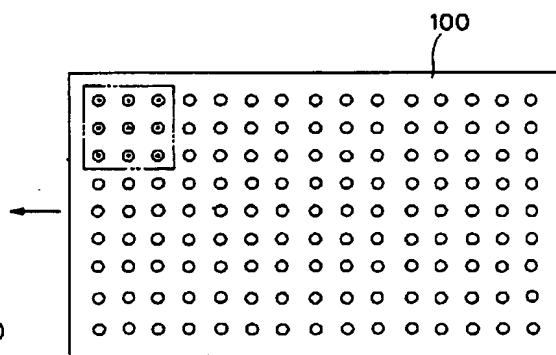
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【手続補正書】

【提出日】平成11年5月28日（1999. 5. 28）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 外径2～10 μ mの複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項2】 基板表面に形成される薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、前記基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項3】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンであることを特徴とする請求項2記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項4】 前記中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通していることを特徴とする請求項1、2又は3記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項5】 基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、
前記穴の内壁に薄膜を形成する工程と、
前記穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、
前記薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項6】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項5記載のマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項7】 基板の一方の表面から内部に向かって所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、
前記複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、
前記細穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、
前記薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項8】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項7記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項9】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工によって行うことを特徴とする請求項7又は8記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項10】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程はICP・RIE加工によって行うことを特徴とする請求項7又は8記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項11】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンからなることを特徴とする請求項5～10のいずれか1項記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項12】 複数の細胞を所定のピッチ配列で保持する細胞保持手段と、
先端が基板から突出した外径2～10 μ mの複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で備えるマイクロキャピラリーアレイと、
前記マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、
前記細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする物質注入装置。

【請求項13】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、
前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイに物質を吸引するステップと、
前記物質を吸引したマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、
キャピラリー中の物質を細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

【請求項14】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、
前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、
キャピラリーを突き刺された細胞中の物質をキャピラリー中に吸引するステップと、
キャピラリー中に吸引された物質を他の細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

【手続補正書】

【提出日】平成11年9月29日（1999. 9. 29）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 外径2～10 μ mの薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して2次元アレイ状に設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項2】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンであることを特徴とする請求項1記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項3】 前記中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通していることを特徴とする請求項1又は2記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項4】 基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、
前記穴の内壁に薄膜を形成する工程と、
前記穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、
前記薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項5】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項4記載のマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項6】 基板の一方の表面から内部に向かって所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、
前記複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、

前記細穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、
前記薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項7】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項6記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項8】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工によって行うことを特徴とする請求項6又は7記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項9】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程はICP・RIE加工によって行うことを特徴とする請求項6又は7記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項10】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンからなることを特徴とする請求項4～9のいずれか1項記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項11】 複数の細胞を所定のピッチ配列で2次元アレイ状に保持する細胞保持手段と、
先端が基板から突出した外径2～10 μ mの薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で2次元アレイ状に備えるマイクロキャピラリーアレイと、
前記マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、
前記細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする物質注入装置。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

ターコード (参考)

C 1 2 N 15/00

A

(72) 発明者 藤田 博之

東京都豊島区千川一丁目9-14

Fターム(参考) 4B024 AA19 AA20 CA01 CA11 DA01
DA02 GA12 GA17 GA18 HA20
4B029 AA23 AA25 BB11 BB12 BB20
CC03 CC08
4B065 AA87X AA87Y AB01 AB10
BA04 BD50 CA53 CA60